



Title	膵管腺癌におけるマイクロ組織レベルの治療抵抗性ダイナミクス [全文の要約]
Author(s)	太田, 悠介
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14482号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/81892">http://hdl.handle.net/2115/81892</a>
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号 : 2598
Note(URL)	<a href="https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/">https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/</a>
File Information	Yusuke_Ohta_summary.pdf



[Instructions for use](#)

# 学 位 論 文(要約)

膵管腺癌におけるマイクロ組織レベルの  
治療抵抗性ダイナミクス

(Chemoresistance dynamics at the microtissue-level  
in pancreatic ductal adenocarcinoma)

2021年3月

北海道大学

太田悠介



# 学 位 論 文(要約)

膵管腺癌におけるマイクロ組織レベルの  
治療抵抗性ダイナミクス

(Chemoresistance dynamics at the microtissue-level  
in pancreatic ductal adenocarcinoma)

2021年3月

北海道大学

太田悠介

## 全体の緒言

膵癌は約 90%が膵管上皮から発生、充実性腫瘍を形成して浸潤・転移が非常に起きやすい膵管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) である。治療には、外科手術、化学療法、放射線療法等の集学的治療が不可欠であるが、治療成績の飛躍的な向上には至っていない。膵癌の発生極早期の段階において既に顕微鏡的マイクロレベルの潜在的な浸潤・播種・転移が起こっていると考えられているが、そのアグレッシブな癌生物学的腫瘍ダイナミクスについては、ほとんどわかっていない。上皮間葉転換 (EMT) は癌の浸潤や転移に不可欠であるとされ、癌の悪性度の進行に必須であることが知られるが、最近、PDAC の腫瘍細胞の浸潤・転移には完全な EMT が必要ではないことが証明され、現在、PDAC の病態理解への根本的な変革が要求されている。当教室ではこれまでに、上皮系フィーダーとの共培養システムを用いて、癌細胞はフィーダーに接着して足場依存性多細胞凝集塊 (anchorage-dependent multicellular aggregate, Ad-MCA) を形成し、癌幹細胞様の治療抵抗性を容易に獲得することを報告してきた。同様の現象は、EMT が誘導される前の上皮系形質を保った PDAC 細胞においても確認されている。そこで本研究では、EMT が誘導される前の適応度の低い癌細胞は、集団組織化することで、単独では達成し得ない強力な生存アドバンテージを獲得するとの仮説を立て、共培養システムや新規に開発した 3D 細胞組織培養デバイスであるマイクロ・ナノ基板を用いて、足場を獲得して細胞が集団組織化した膵癌微小腫瘍組織を対象に PDAC の治療抵抗性の本質に迫った。

第一章では、HEK293T 直接共培養システムを用いて、EMT を起こす前の Ad-MCA 形成 PDAC 細胞が、さらなる難治性を獲得することを明らかにした。

第二章では、癌細胞のみで PDAC の Ad-MCA 様の微小腫瘍の形成を誘導可能なマイクロ・ナノ基板を開発し、PDAC のマイクロ組織レベルの難治性獲得の機序についてダイナミクス解析を行った。

第三章では、EMT の進行度が異なる複数の PDAC 細胞株の腫瘍ダイナミクス解析を行い、EMT 進行のマイクロ組織レベルにおける影響を可視化した。

本研究により、細胞単体ではなく、多細胞集団組織 (マイクロ組織) レベルの EMT で実際に引き起こされている挙動を体外で可視化して理解することは、PDAC の病態を理解する上で非常に重要であることが考えられ、より効果的な抗癌剤の開発へと繋がることが期待される。

## 第一章

# 膵癌細胞における足場依存性多細胞凝集塊(Ad-MCA)は さらなる治療抵抗性を獲得する

### 【緒言】

膵癌は、診断技術や治療法が向上しているにも関わらず、10年生存率が6%以下と他の癌と比較して極めて予後不良である。進行性膵癌に対する標準的な化学療法として、ゲムシタビン(GM)が用いられることが多いが、あまり生存率が改善されていない。膵癌が予後不良である要因として、早期発見が難しいこと、浸潤が強いことや早期から転移が起ること、GMなどの有糸分裂を阻害する薬剤に対して強い治療抵抗性を示すことなどが挙げられる。GMがPDAC細胞に対して与える影響として、活性酸素(ROS)依存的なC-X-C chemokine receptor 4(CXCR4)の発現の亢進がPDAC細胞の浸潤能を促進させることが報告されている。膵癌でも、ごく少数の細胞集団、癌幹細胞(cancer stem cell, CSC)が存在すると考えられている。CSCは、細胞周期が静止状態であるという特徴があり、これによって分裂期の細胞を標的として作用するGMなどの多くの抗癌剤に対して抵抗性を獲得することが知られる。CSCの周囲微小環境はニッチと呼ばれるが、ニッチ構成細胞がどのようにCSCを産出し、その維持に関与するのかといった詳細なメカニズムについては、*in vitro*において、ニッチを再現し、CSCを産生することが困難なこともあり、未だ不明な点が多い。

CD44は、接着分子でありヒアルロン酸レセプターであるが、CSCのマーカーとしても知られており、結腸癌細胞へ幹細胞特性を直接的に誘導することが報告されている。正常組織ではCD44スタンダードフォーム(CD44s)として存在するが、癌細胞においては、選択的スプライシングによって多くのバリエーション(CD44v)が形成され、それぞれが異なった機能を有しているとされる。EMTの段階において、CD44vからCD44sへのアイソフォームスイッチングが起こり、中でも、CD44v8-10は、CSCにおける細胞ストレス耐性に関与することが明らかとなっている。

これまで当教室では、上皮系フィーダー細胞とリンパ腫細胞を直接共培養すると、足場依存性多細胞凝集塊(anchorage-dependent multicellular aggregate, Ad-MCA)を形成し、その一部が細胞周期静止状態で、CD44を強発現したCSC様フェノタイプを獲得したことを報告してきた。この結果より、組織浸潤リンパ腫細胞の難治性は、CSC様のフェノタイプを獲得することが部分的な要因である可能性が示唆されている。さらに、最近、多細胞凝集体(MCA)の形成は、濾胞性リンパ腫の遺伝子発現、増殖、薬剤耐性、及び免疫回避に関与することが報告されて

いる。以上のことから、Ad-MCA 形成は、腫瘍の悪性度に寄与している可能性が考えられた。しかしながら、膵癌の MCA や Ad-MCA のような集団細胞形成の根底にあるメカニズムについては未知な部分が多い。そこで本研究では、細胞工学分野に広く用いられる HEK293T 細胞を上皮系フィーダー細胞として用いた実験系を確立し、周囲微小環境による膵癌の細胞集団としての悪性形質獲得の機序について検討した。

### 【実験方法】

予め単層培養したヒト腎上皮様 (HEK293T) 細胞及びヒト皮膚線維芽 (NHDF) 細胞に 7 種の CD44 陽性 PDAC 細胞株を一晩直接共培養することにより以下の解析を行った。なお、これらの実験では、一方の細胞を CFSE 標識することで 2 種の細胞を識別した。GM 暴露によるアポトーシス細胞はフローサイトメトリー法を用いて測定した。共培養した細胞は、抗 CD44 抗体、CD44v8-10 を認識する抗 CD44v9 抗体、抗 Ki-67 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。共培養における CD44v アイソフォームの変化は、細胞ソーティングにより PDAC 細胞を分離して RT-PCR 法により検討した。in vivo での評価は、重症複合免疫不全 (SCID) マウスに二色に標識した PDAC 細胞を腹腔内投与して腹膜播種モデルを作製した。トランスクリプトームの変化は、PDAC 細胞をフィーダーから分離せずにマイクロアレイ解析した。共培養した PDAC 細胞から得られた遺伝子プロファイルの臨床的関連性は、NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) から得られた計 220 人の膵癌患者の外科切除検体 (正常部位と腫瘍部位) におけるマイクロアレイ解析結果のデータセットを使用して検討した。

### 【結果】

上皮系形質を保った CD44 陽性 PDAC 細胞は、HEK293T 細胞と一晩直接共培養すると、表面に CD44 を表面に強発現した強固な Ad-MCA を形成した。GM 感受性を示す CD44v3-10<sup>high</sup>/CD44s<sup>low</sup> PDAC 細胞では、単独培養時と比較し、CD44v8-10 の高発現、GM 治療抵抗性及び、Ki-67 陰性の細胞周期静止状態が認められ、CSC 様のさらなる難治性を獲得することを明らかにした。一方、間葉系形質である MIA PaCa-2、PANC-1 細胞はそのような現象は認められなかった。CD44v3-10<sup>high</sup>/CD44s<sup>low</sup> PDAC 細胞と NHDF 細胞との共培養でも、Ad-MCA は形成せず、GM 治療抵抗性も獲得しなかった。SCID マウスに腹腔内移植された PCI-55 細胞は、移植後 1 日で腹膜上に in vitro と同様の CD44v9 高発現 Ad-

MCA を形成した。膵癌患者 220 人分のトランスクリプトームと比較した結果、共培養によって発現量が大きく低下した 24 遺伝子は、ヒト膵癌患者腫瘍部位で発現が有意に上昇している遺伝子群であった。

#### 【考察】

HEK293T 細胞との直接共培養によって、CD44v3-10<sup>high</sup>/CD44s<sup>low</sup> PDAC 細胞は、さらなる悪性度の高い Ad-MCA を形成することを明らかにした。PDAC 細胞のトランスクリプトームは、Ad-MCA を形成することによって一晩で変化し、一時的に一部の遺伝子群が正常組織のプロファイルに戻るということがわかった。したがって、PDAC 細胞は、Ad-MCA を形成することで、まるで正常組織であるように遺伝子発現を変化させ、分子標的薬等の抗癌剤に対する治療抵抗性を獲得している可能性が考えられた。

なお、共培養システムでは、PDAC 細胞と HEK293T 細胞を分離する必要性があり Ad-MCA 形成 PDAC 細胞のみを解析することが困難であるため、第二章以降では、癌細胞のみで PDAC の Ad-MCA 様の微小腫瘍の形成を誘導可能な 3D 細胞組織培養デバイスの開発を行い、ダイナミクス解析を施行した。



## 第二章

### 細胞内細胞浸潤を介して自己組織化した 膵微小腫瘍のダイナミクスの可視化

#### 【緒言】

これまでの *in vitro* 研究では、単一細胞や単層培養が主流であり、生きたままで癌腫瘍組織の動態や挙動(ダイナミクス)をライブイメージング観察する技術は、非常に乏しい。このことから、現在、*in vivo* での病態生理学的な検討として、マウス等の腫瘍モデル動物の組織病変部位を固定したものを病理組織学的に観察する手法や腫瘍の大きさ、位置を特定する画像診断を用いているのが現状である。したがって、生きている癌腫瘍組織のダイナミクスについては未知な部分も多く、現在の癌研究における手法では、細胞レベルの *in vitro* 解析と組織レベルの *in vivo* 解析には大きな隔たりが存在するが、その解析技術の不在によって、あまり意識されていない。それゆえ、生きている癌腫瘍組織のダイナミクスについては未知な部分が多い。実際、分子標的薬を用いた臨床試験において、*in vitro* と *in vivo* の間で異なる結果が得られる等の予期しない困難がかなり多く生じているのが現状である。このような臨床試験時の困難性を軽減させるため、近年、癌研究の分野において、細胞を集団組織として捉える、三次元(3D)細胞培養技術の重要性が非常に高まっている。その理由は、3D 培養技術が、従来の 2D 培養技術と比較して、生理学的に *in vivo* により近い環境を模倣していると考えられているからである。

膵癌は、その90%がPDACであり、標準的な化学療法として、FOLFIRINOX や GM が用いられるが、あまり生存率が改善されていない。KRAS 遺伝子変異は、PDAC の前癌病変である膵上皮内腫瘍性病変(PanIN)の起因であるとされる。近年の報告では、わずか14か月で、ステージ1から4への急速な進行がおこり、その一端は膵癌細胞分裂時のDNA複製の破局的崩壊によって引き起こされることが明らかとなってきた。このように、PDACは、非常にアグレッシブな特性を有することは報告されているが、PDAC腫瘍のダイナミクスについては十分に研究がなされてはいない。そこで本研究では、生きているPDACの腫瘍ダイナミクスを体外で可視化するために、はじめに、半導体製作に用いられる微細加工技術を応用し、Ad-MCA様の足場依存性の微小腫瘍組織の自己組織化を誘導できる新規3D培養デバイスである、「マイクロ・ナノ基板」を独自に開発した。本基板の開発によって、我々は、培養した癌細胞が微小な癌腫瘍組織を自己形成する様子を生きたまま体外で観察することを世界で初めて可能にした。これにより、足場依存性PDAC微小腫瘍は、ライブイメージング解析によって、形態学的な極性を示し、細胞複合体から成る葉状仮足や糸状仮足を介して活発な運動性を有することを明らかにした。

## 【方法】

本学情報科学研究所との異分野共同研究で、半導体技術を応用したガラス基板の微細加工技術により、生きている微小な癌腫瘍組織(微小腫瘍)の生態をライブイメージング可能なマイクロ・ナノ基板を開発した。具体的には、本基板上で培養した癌細胞が微小腫瘍を自己形成する様子をタイムラプス撮影した。免疫蛍光染色法によりPDAC 微小腫瘍の3D 画像解析を行った。*in vivo*での評価は、SCID マウスに PDAC 細胞を腹腔内投与して作製した腹膜播種モデルマウス及び、ヒトPDAC 病理検体を用いた。基板上での微小腫瘍の挙動は、生細胞アッセイとして Annexin V/EthD-1、ヌクレオシドの検出に Edu を用いてライブイメージング解析した。癌の免疫回避については、NK 細胞と微小腫瘍との共培養を施行した。

## 【結果】

今回独自に開発したマイクロ・ナノ基板は、スライドカバーガラスに MPC ポリマーをコートした細胞非接着面に細胞接着可能なナノスケールの粗さのあるマイクロスケールのパターンを持つ。播種した PDAC 細胞は、パターンを跨いで足場を形成して微小腫瘍を自己組織化した。本基板上での培養によって、PDAC 細胞は細胞内細胞浸潤(エントーシス)を介して、組織運動極性を持つ PDAC 微小腫瘍を形成した。また、PDAC 微小腫瘍は、体表面に  $\alpha$ -tubulin の高発現を示し、*in vivo*においても同様な結果が得られた。ヒト PDAC 病理組織と比較検討したところ、大きさ、細胞内細胞構造、管腔形成を含む構造が非常に類似していた。また、PDAC 微小腫瘍は、伸長しながら、細胞複合体から成る巨大な葉状仮足や糸状仮足を用いて死細胞デブリスを捉えることがわかった。エンドサイトーシスを介してヌクレオシド(Edu)を直接、液胞に取り込み、死細胞由来の Annexin V で標識されるフォスファチジルセリン(PS)を微小腫瘍の体表面に蓄積させることを明らかにした。PDAC 微小腫瘍は、NK 細胞と共培養したところ、NK 細胞から攻撃されなかった。

## 【考察】

マイクロ・ナノ基板上で自己組織化した成熟 PDAC 微小腫瘍は、体表面に PS を蓄積させることを明らかにした。PS を細胞膜に発現させることは、癌の免疫回避の要因であることが報告されていることから、成熟 PDAC 微小腫瘍は免疫細胞から死んだ組織として認識され、攻撃を回避した可能性が示唆された。本研究によって、PDAC の腫瘍ダイナミクスを体外で可視化することは、革新的な新規抗癌剤の開発に役立つことが示唆された。

### 第三章

## 膵管腺癌細胞の上皮間葉転換の状態に依存する 微小腫瘍のダイナミクス

#### 【緒言】

EMT はバイナリー過程であると広く知られてきたが、最近、いくつかの中間型 (hybrid epithelial/mesenchymal) を介して進行する多段階の過程であることが報告された。一方、膵癌モデルである KPC マウスにさらに EMT 誘導遺伝子である Snail または Twist を欠損させた KPC マウスにおいても、PDAC の浸潤・転移が KPC マウスと変わらず誘導されることが報告されている。このように、EMT は癌の浸潤・転移に不可欠であるとされてきたが、定説とは不一致な報告が相次いでいる。我々は、このような不一致を細胞レベルだけではなく、組織レベルにおける EMT の理解が不足しているからであると考えた。EMT が細胞レベルで進行する際の PDAC のダイナミクス変化は、*in vitro* 及び、*in vivo* の両面から十分に検討されているが、EMT の進行による生きている PDAC 腫瘍のダイナミクスへの影響は検討されていない。そこで本研究では、マイクロ組織レベルの EMT の腫瘍ダイナミクスを理解するために、マイクロ・ナノ基板を使用して、異なる EMT の進行度を示す PDAC 細胞から自己組織化させた微小腫瘍のダイナミクス解析を行った。本研究によって我々は、EMT の進行度が微小な癌組織レベルの挙動を変化させ、そのダイナミクスに影響を与える可能性があることを初めて示した。さらに、PDAC の重要な病理学的な特徴である管腔構造が生きている成熟した微小腫瘍においてどのように形成されるのかを明らかにした。

#### 【方法】

異なる EMT の進行度を示す 5 種の PDAC 細胞株をマイクロ・ナノ基板上で自己組織化させて用いた。培養 1 日後に、免疫蛍光染色及びライブイメージング解析を行い、EMT の進行度が足場依存性、伸張性、腫瘍の大きさ、管腔構造の形成及び、有糸分裂期細胞の位置に与える影響について検討した。また、*in vivo* での評価は、ヒト PDAC 病理検体を用いた。

#### 【結果】

微小腫瘍は、EMT の進行によって、マイクロスケールパターンへの足場依存性及び、伸張性が低下することがわかった。また、EMT の進行度は、微小腫瘍の大きさ、管腔構造の形成及び、有糸分裂期細胞の位置といったマイクロ組織レベルで、成熟 PDAC 微小腫瘍のダイナミクスに大きく影響を与えた。

### 【考察】

本研究によって、マイクロ組織レベルの EMT 進行による、PDAC 微小腫瘍のダイナミクス変化は、PDAC の強い治療抵抗性に寄与することが示唆された。EMT が腫瘍のダイナミクスに与える影響について理解することは、PDAC を克服する上で非常に重要であることが考えられた。

## 総括および結論

### 【第一章】

本研究によって得られた新知見は次の通りである。

- ・上皮系形質を保った CD44 陽性 PDAC 細胞株は、HEK293T 細胞との直接共培養によって、CD44 強陽性 Ad-MCA を形成した。
- ・Ad-MCA を形成した CD44v3-10<sup>high</sup>/CD44s<sup>low</sup> PDAC 細胞のみ、GM 抵抗性、細胞周期静止状態の CD44v8-10<sup>high</sup> 癌幹細胞様のさらなる難治性を獲得した。
- ・*in vitro*と同様な Ad-MCA の形成はマウス腹膜播種モデルでも誘導された。
- ・HEK293T と直接共培養された PDAC 細胞において、発現量が大きく低下した 24 遺伝子は、ヒト膵癌患者腫瘍部位で発現が有意に上昇している遺伝子群であった。

以上の結果より、PDAC 細胞は、Ad-MCA を形成することで、癌幹細胞様の治療抵抗性を獲得、さらに、あたかも正常組織であるかのように遺伝子発現パターンを変化させることによって、分子標的薬等の抗癌剤の標的にはならない可能性が示唆された。EMT が誘導される前の適応度の低い癌細胞は、集団組織化することで、単独では達成し得ない強力な生存アドバンテージを獲得する可能性が考えられた。直接共培養系ゆえに、その後の詳細な解析の困難性が生じたため、第二章以降では細胞を自己組織化させることが可能な新規デバイスの開発を行い、ダイナミクス解析を行った。

### 【第二章】

本研究によって得られた新知見は次の通りである。

- ・マイクロ・ナノ基板上での培養によって、パターンを跨いで足場を形成して微小腫瘍を自己組織化した。
- ・PDAC 細胞はエントーシスを介して PDAC 微小腫瘍を形成し、組織運動極性を

獲得、管腔へと分化成熟した。

- PDAC 微小腫瘍は、PDAC 外科検体の腫瘍部位における、大きさ、細胞内細胞構造、管腔形成を含む構造が類似した。
- PDAC 微小腫瘍は、伸長しながら、細胞集合体によって形成された仮足によって死細胞デブリ由来の核酸を直接腫瘍体内へ取り込み、死細胞由来フォスファチジルセリン(PS)を腫瘍の体表面に大量に蓄積した。
- PDAC 微小腫瘍は、NK 細胞からの攻撃を回避した。

以上の結果より、PDAC 微小腫瘍は、体表面に PS を蓄積させることにより、見かけ上は死細胞の表現型となることで、免疫細胞から攻撃対象として認識されず、癌の免疫回避の要因となる可能性が示唆された。

### 【第三章】

本研究によって得られた新知見は次の通りである。

- PDAC 微小腫瘍は、EMT の進行度に応じ、マイクロスケールパターンへの足場依存性、伸張性が低下した。
- EMT の進行度の異なる PDAC 細胞によって自己組織化された微小腫瘍は、大きさ、管腔構造の形成率及び、有糸分裂期細胞の位置が異なった。

以上の結果より、PDAC 細胞の EMT 進行度は、腫瘍ダイナミクスに大きく影響を与えることが示唆された。

### 【全体の総括および結論】

一連の研究によって、EMT が誘導される前の適応度の低い PDAC 細胞は、集団組織化することで、単独では達成し得ない強力な生存アドバンテージを獲得することを明らかにした。PDAC の細胞集団組織としての腫瘍ダイナミクスの機序の詳細に理解することは、PDAC の激しい治療抵抗性の本質に迫ることとなり、今後は、より効果的な新規 PDAC 治療法の開発にも役立つことが期待された。